Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 18, No. 1, Spring. 2020, p. 49-59

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹، ص. ۵۹-۴۹

بررسی اثر القاکننده‌های تولید گره بر خصوصیات فیزیولوژیکی، عملکرد و خصوصیات گره‌زایی یونجه (*Medicago sativa* L.) در شرایط شوری

رقیه مردانی[1*]، کاظم پوستینی[2]، علیرضا عباسی[3]، احمدعلی پوربابایی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۰۵

چکیده

لوتئولین یکی از مهم‌ترین فلاونوئیدها است که توسط بذرهای در حال جوانه‌زنی یونجه ترشح می‌شود. در این مطالعه تاثیر لوتئولین بر بیان ژن گره‌زایی دو سویه *Rhizobium meliloti* با استفاده از پلاسمید حامل پروموتور nodA و ژن *lacZ* از باکتری *Escherichia coli* و توسط فعالیت آنزیم β-galactosidase مورد بررسی قرار گرفت. لوتئولین بیان ژن nod را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. سپس تاثیر لوتئولین و ترشحات بذر بر گره‌زایی و عملکرد یونجه در شرایط تنش شوری و بدون شوری مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی، در سه تکرار و تیمارهای شوری، ارقام یونجه، سویه باکتری و نوع کاربرد القاکننده‌های خارجی اجرا شد. سطوح شوری شامل: شاهد (بدون شوری) و آب با شوری ۱۵دسی‌زیمنس بر متر، روش به‌کارگیری القاکننده‌ها در سه سطح (پیش‌تیمار سویه‌های *ریزوبیوم* با لوتئولین، استفاده از لوتئولین و ترشحات بذر به‌طور مستقیم روی سطح بذر و شاهد) دو رقم یونجه (G/۰۲۲ و G/۰۱۹) و سویه‌های باکتری شامل سویه حساس و مقاوم به شوری بود. در شرایط شوری تیمار بذرهای یونجه با القاکننده‌ها، وزن خشک اندام هوایی و ریشه و ارتفاع گیاه را به‌طور متوسط ۳۰٪، تعداد گره را ۴۷٪ افزایش داد ولی بر غلظت کلروفیل تاثیر معنی‌داری نداشت. همچنین، شوری موجب افزایش چهار برابری پرولین نسبت به شرایط عادی شد که استفاده از لوتئولین و ترشحات بذر، پرولین را در شرایط شوری به‌ترتیب ۱/۶۶ و ۱/۳۵ برابر افزایش داد ولی در شرایط عادی کاربرد القاکننده‌ها تاثیر معنی‌داری بر محتوای پرولین نداشت. همچنین، شوری محتوای سدیم برگ (۷ برابر) و ریشه (۸/۵ برابر) را افزایش داد و محتوای پتاسیم این اندام‌ها را به‌ترتیب ۲۹٪ و ۲۴٪ کاهش داد که کاربرد لوتئولین و ترشحات بذر تا حدی این تغییرات را تعدیل کرد. در این آزمایش، در تمام صفات مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری بین شاهد و پیش‌تیمار باکتری‌ها با لوتئولین مشاهده نشد. به‌طور کلی، نتایج این آزمایش نشان داد که لوتئولین و ترشحات بذر می‌تواند به‌عنوان القاکننده خارجی در بهبود رشد و گره‌زایی یونجه در شرایط شور و عادی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: القاکننده خارجی، ترشحات بذر، لوتئولین، ژن *lacZ*

مقدمه

در لگوم‌ها مانند همه گیاهان نه تنها مساله تحمل به شوری مهم است، بلکه تحمل همزیستی آن‌ها به شوری نیز مهم است. همزیستی از هر یک از همزیست‌ها (لگوم و ریزوبیوم) به شوری حساس‌تر است. شوری منجر به کاهش رشد گیاه، تعداد ریشه‌های مویین، تغییر شکل ریشه‌های مویین، کاهش تبادلات پیامی بین دو همزیست (Miransari and Smith, 2009)، کاهش رشد ریزوبیوم‌ها (Tu, 1981)، کاهش پیچش ریشه‌های مویین (Miransari and Smith, 2009; Zahran and Sprent, 1986; Tu, 1981)، کاهش توسعه ریشه‌های مویین (Zahran and Sprent, 1986)، تغییر شکل رشته سرایت، کاهش تعداد گره‌ها (Soussi *et al.*, 1999; Zahran and Sprent, 1986; Tu, 1981; Bouhmouch *et al.*, 2005)، افزایش قند و پروتئین در گره‌ها (Soussi *et al.*, 1999) و کاهش فعالیت احیای استیلن (Soussi *et al.*, 1999) می‌شود. تثبیت نیتروژن در بسیاری از گونه‌ها در شوری ۵۰ mM NaCl تقریباً ۵۰٪ کاهش می‌یابد (Bruning and Rozema, 2012). در کل، تثبیت نیتروژن نسبت به تولید زیست‌توده بیشتر تحت تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرد (Bruning and Rozema, 2012). در شرایط تنش شوری تعداد ریزوبیوم‌ها نیز کاهش می‌یابد (Tu, 1981)، با این حال بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهد که ریزوبیوم‌ها به شوری مقاوم‌تر از لگوم‌ها هستند (Bruning and Rozema, 2012).

برای شروع گره‌زایی، هر دو همزیست (گیاه میزبان و میکروب) برای برقراری ارتباط با هم‌دیگر مولکول‌هایی را ترشح می‌کنند. گیاه میزبان فلاونوئیدها را برای جذب ریزوبیوم‌ها ترشح می‌کند، این تبادل پیام نیز تحت تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرد (Miransari and Smith, 2009; Oldroyd and Downie, 2004). علاوه بر فلاونوئیدها، پیام‌های گیاهی شامل بتائین‌ها، آلدونیک اسیدها،

۱- دانشجوی دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۲- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴- دانشیار گروه خاک‌شناسی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: rm.mardani@ut.ac.ir)
DOI: 10.22067/gsc.v18i1.71885

زانتون‌ها، فنولیک‌های ساده و جاسمونات‌ها هستند که مشاهده شده است همه آن‌ها به‌عنوان القاکننده‌های ژن‌های nod عمل می‌کنند (Cooper, 2007).

فعال شدن ژن‌های گره‌زایی و نسخه‌برداری آن‌ها منجر به سنتز Nod فاکتورهای chitooligosaccharide می‌شود (Mulligan and Long, 1989). تشخیص Nod فاکتورهای خاص توسط ریشه مویین گیاه منجر به آغاز پاسخ‌های سازمان‌یافته‌ای در ریشه گیاه می‌شود. ریشه‌های موئین پیچ می‌خورند و تولید یک فرورفتگی در دیواره سلولی (رشته سرایت) می‌کنند، تا باکتری‌ها از طریق آن وارد ریشه شوند و تصور می‌شود که Nod فاکتورهای باکتریایی منجر به اختصاصی بودن رابطه همزیستی می‌شود. Nod فاکتورها موجب تجمع فلاونوئیدها، مهار انتقال اکسین و تقسیم سلولی در کورتکس ریشه می‌شوند و در نتیجه منجر به تشکیل پریموردیای گره می‌شوند. رشته سرایت باکتری‌ها را در پریموردیای گره آزاد می‌کند و فرآیند ادامه می‌یابد تا منجر به تثبیت نیتروژن در گره‌ها شود (Hirsch, 1992; Perret *et al*., 2000).

شواهدی وجود دارد که استفاده از القاکننده‌های خارجی بیان ژن‌های nod گره‌زایی، عملکرد و گره‌زایی را در برخی از گونه‌های لگوم‌ها در شرایط عادی و تنش افزایش می‌دهد (Kapulnik *et al*., 1987; Begum *et al*., 2001; Abd-Alla 2014; Ghasem *et al*., 2012; Hungria and Phillips 1993).

بنابراین، این آزمایش با هدف بررسی تاثیر لوتئولین و ترشحات بذر یونجه به‌عنوان القاکننده‌های خارجی بر بهبود بیان ژن گره‌زایی ریزوبیوم و عملکرد و گره‌زایی یونجه در شرایط تنش شوری به‌اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

آزمایش ۱: تاثیر لوتئولین بر بیان ژن گره‌زایی *R. Meliloti*

بررسی تاثیر لوتئولین بر بیان ژن nodA ریزوبیوم با استفاده از روش β-galactosidase (Miller, 1972) انجام شد. در این روش از پلاسمید pMPA221 (تهیه شده از دانشگاه Maria Curie-Skłodowska لهستان) حاوی PnodA–lacZ (پروموتور ژن گره‌زایی A و ژن بدون پروموتور lacZ از باکتری اشرشیاکولی) استفاده شد. lacZ آنزیم β-galactosidase را کد می‌کند، این آنزیم لاکتوز را به گلوکز و گالاکتوز تجزیه می‌کند.

برای انجام آزمایش ابتدا پلاسمید باید وارد باکتری‌های ریزوبیوم می‌شد که این کار با استفاده از الکتروپوریشن انجام شد. در این روش به ۹۰µl (تقریباً ۵×$۱۰^{۸}$) باکتری مستعد ریزوبیوم (Garg *et al*., 1999)، 5µl (تقریباً ۵۰ng) پلاسمید اضافه شد و ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. باکتری‌ها با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن در ۱۸۰۰V، ۲۰۰Ω و ۵۰µF الکتروپوریت شدند (پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری). سپس ۲۴ ساعت در محیط YEM در شیکر در دمای ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت باکتری‌ها به محیط جامد YMA که حاوی تتراسایکلین (پلاسمید مقاوم به تتراسایکلین می‌باشد) بود منتقل شد. بعد از دو تا سه روز کلونی‌ها به محیط تازه منتقل شدند. باکتری‌های حاوی پلاسمید در این روش مورد استفاده قرار گرفت.

ریزوبیوم‌هایی که دارای پلاسمید بودند به محیط YEM حاوی تتراسایکلین اضافه شدند، و به مدت ۳ تا ۵ روز، در شیکر ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشده داده شدند به‌طوری‌که OD_{620} آن‌ها به ۰/۴ رسید، سپس با استفاده از محیط رشد تازه OD_{620} آن‌ها به ۰/۱ رسانده شد. باکتری‌ها به مقدار مساوی در تیوب‌ها توزیع شدند و مقداری از لوتئولین به آنها اضافه شد که غلظت نهایی این القاکننده در تیوبها به ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰µM رسید. شاهد فاقد القاکننده بود و به‌دلیل استفاده از اتانول برای تهیه محلول لوتئولین، از اتانول به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس، تیوب‌ها به مدت ۱۸ ساعت در شیکر ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. و بعد از این مدت، آزمایش فعالیت β–galactosidase انجام شد. تا زمان انجام آزمایش باکتری‌ها را می‌توان در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

این روش، بیان ژن nod (ژن گره‌زایی) در اثر القاکننده (لوتئولین) را به شکل غیرمستقیم توسط مقدار فعالیت آنزیم β–galactosidase اندازه می‌گیرد. در این روش، ۰/۵ml از باکتری‌ها با بافر Z به حجم ۱ml رسانده شدند (بافر Z: $Na_2HPO_4.7H_2O$ ۱۶/۱ گرم، $NaH_2PO_4.H_2O$ ۵/۵ گرم، KCl ۰/۷۵ گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۲۴۵ گرم، β-mercaptoethanol ۲/۷ گرم در ۵۰۰ml آب با PH ۷/۰)، ۴۰µl تولوئن اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس ۰/۲ml ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) در غلظت $4mg.ml^{-1}$ به تیوبها اضافه شد. ONPG شبه لاکتوز است که در اثر آنزیم β-galactosidase تجزیه می‌شود و تولید رنگ زرد می‌کند. پس از اضافه کردن ONPG، باکتری‌ها دوباره در بن‌ماری دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند تا تغییر رنگ دهند (رنگ زرد). طبق یک آزمایش مقدماتی، این مرحله در زمانه‌ای مختلف از ۱۵ دقیقه تا ۲۴ ساعت انجام شد بهترین زمان برای این مرحله یک ساعت بود. بعد از یک ساعت واکنش توسط Na_2CO_3 یک مولار متوقف شد.

بعد از توقف واکنش، تیوب‌ها در ۷۲۰۰ g به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شدند و باکتری‌ها حذف شد و OD_{420} محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. در کوویت دیگر ۰/۵ml از باکتری‌ها با بافر Z به حجم ۱ml رسانده شد و OD_{600} آن خوانده شد. این آزمایش سه بار در سه تکرار انجام شد. فعالیت β –galactosidase با استفاده از

معادله (۱) در واحد میلر (Miller units) اندازه‌گیری شد (Mabood and Smith 2005).

$$\beta\text{-galactosidase activity (Miller units)}=\frac{(OD420\times1000)}{(OD600\times T\times V)} \quad (۱)$$

که در آن:

T: زمان واکنش (دقیقه) در این آزمایش یک ساعت بود.

V: حجم محیط باکتری‌ها (میلی‌لیتر) می‌باشد.

آزمایش ۲: تاثیر کاربرد خارجی لوتئولین بر عملکرد و گره‌زایی یونجه

برای بررسی تاثیر پیش‌تیمار *R. meliloti* با لوتئولین به‌عنوان القاکننده ژن *nod* و آغشته کردن بذور یونجه با لوتئولین و ترشحات بذر بر گره‌زایی، رشد و عملکرد یونجه آزمایشی در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. با توجه به آستانه تحمل شوری یونجه، سطوح شوری شامل شاهد (آب معمولی) و ۱۵دسی‌زیمنس بر متر (در این شوری ۷۰٪ عملکرد یونجه کاهش می‌یابد)، روش به‌کارگیری القاکننده‌ها شامل ۱- پیش‌تیمار سویه‌های ریزوبیوم با لوتئولین ۲- آغشته کردن بذور یونجه با لوتئولین و ترشحات بذر ۳- شاهد، دو رقم یونجه (G/۰۲۲ و G/۰۱۹) تهیه شده از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور و سویه‌های باکتری شامل سویه حساس و مقاوم به شوری بود.

برای پیش‌تیمار باکتری‌ها، باکتری‌های R. *meliloti* به مدت ۴۸ ساعت در پتری‌دیش‌های حاوی محیط YMA (Yeast Mannitol Agar) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. سپس یک کلونی منفرد از پتری‌دیش‌ها در ۴ml محیط YMB (yeast mannitol broth) قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. سپس مجدداً به ۴۰۰ml محیط تازه YMB منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، با توجه به تعداد گلدان‌ها و مقدار مورد نیاز، در ارلن‌های ۱۰۰ ml توزیع شد و مقداری لوتئولین به آن اضافه شد که غلظت نهایی لوتئولین در باکتری‌های مقاوم و حساس به شوری به‌ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار رسید. ارلن شاهد فاقد لوتئولین بود. ارلن‌ها در شیکر در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک روز قرار گرفتند (مقدار استفاده شده از ترکیب القاکننده ژن‌های تولید گره بر اساس نتایج آزمایش بتاگالاکتوزیداز بود (شکل ۱)).

بذرهای یونجه با هیپوکلریت (۲/۵٪) ضدعفونی شد و سپس چندین بار با آب مقطر شسته شدند، به‌منظور آغشته کردن بذرها با ریزوبیوم تلقیح شده از صمغ عربی استفاده شد. برای این منظور از صمغ عربی ۱۰٪ استفاده شد که ابتدا بذرها در محلول صمغ عربی قرار داده شدند. سپس باکتری‌ها به بذرها اضافه شدند تا بذرها کاملاً آغشته به باکتری‌ها شوند. البته قبل از استفاده، به‌منظور افزایش غلظت باکتری‌ها، باکتری‌ها ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و سپس در کلرید سدیم ۵٪ دوباره حل شدند. بذرها بلافاصله در گلدان‌های حاوی پرلیت به تعداد ۱۰ عدد در هر گلدان کاشته شدند. که بعد از رشد تعداد بوته‌ها در هر گلدان به ۵ عدد کاهش داده شد.

برای استفاده مستقیم لوتئولین و ترشحات بذر روی سطح بذر، به‌ترتیب از محلول ۲۰۰µM و ۵۰٪ لوتئولین و ترشحات بذر استفاده شد. مقداری از این محلوها استفاده شد، که کاملاً سطح بذرها را پوشش دهد. سپس بذرها در گلدان‌هایی که قبلاً ریزوبیوم اضافه شده بود، کاشته شدند.

برای تهیه ترشحات بذر یونجه (*Medicago sativa* L.)، ابتدا بذرها ضدعفونی شدند و در فلاسک برای هر گرم بذر، ۲ تا ۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد، و در شیکر (۱۲۰ r.min^{-1}) ۲۲- ۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند سپس ترشحات جمع شدند و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Tambalo *et al.*, 2013).

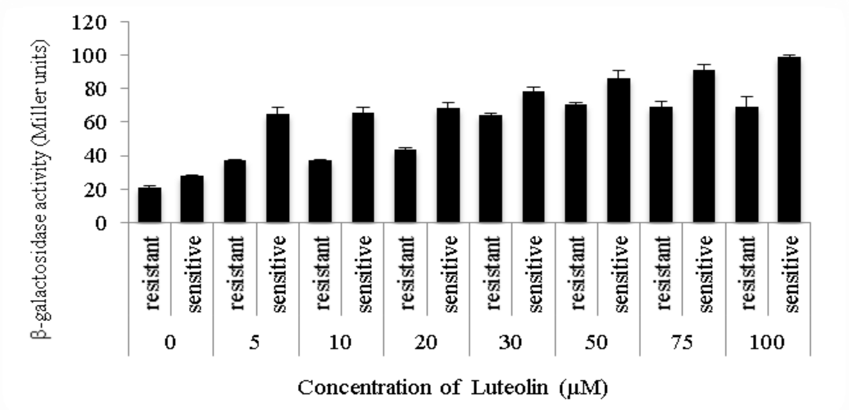
در مرحله سه یا چهار برگی بوته‌ها، شوری همراه با محلول هوگلند اعمال شد (Miransari and Smith, 2009). آبیاری گلدان‌ها با محلول اصلاح‌شده هوگلند انجام شد که در آن $CaNO_3$ و KNO_3 توسط ۱mM $MCaCl_2$، ۱mM K_2HPO_4 و ۱mM KH_2PO_4 جایگزین شدند تا یک محلول فاقد نیتروژن تهیه شود. در مرحله شروع گلدهی صفات عملکرد، ارتفاع بوته، تعداد گره و غلظت کلروفیل، محتوای پرولین و محتوای سدیم و پتاسیم به‌ترتیب بر اساس روش آرنون (Arnon , 1967)، Bates *et al.* (1973) و فلیم فتومتری اندازه‌گیری شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از برنامه SAS (version 9. 1. 3) و برای رسم نمودار از Excel استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از خطای استاندارد و آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

نتایج و بحث

تاثیر لوتئولین بر بیان ژن گره‌زایی R. *meliloti*

فعالیت β –galactosidase نشان داد که لوتئولین بیان ژن گره‌زایی را در هر دو سویه (سویه‌های مقاوم و حساس به شوری) تحریک می‌کند. بیان ژن nod در هر دو سویه تحت تاثیر غلظت لوتئولین قرار گرفت ولی واکنش این دو سویه به غلظت لوتئولین متفاوت بود. به‌طوری‌که در سویه مقاوم به شوری فعالیت القایی لوتئولین تا غلظت ۵۰µM افزایش یافت و سپس ثابت ماند در حالی‌که، در سویه حساس به شوری با افزایش غلظت لوتئولین تا ۱۰۰µM فعالیت القایی آن نیز افزایش یافت (شکل ۱). آزمایش‌های متعدد نشان داده است که استفاده از القاکننده خارجی منجر به افزایش بیان ژن‌های گره‌زایی می‌شود (Maj *et al.*, 2008; Mabood and

(Smith 2005; Pérez-Montaño *et al.*, 2011). به نظر می‌رسد تاثیر القاکننده‌ها بر ژن‌های nod خاص هر سویه است و تاثیر متفاوت بر سویه‌ها دارند که ممکن است در رقابتی بودن سویه‌ها تاثیر بگذارد (Maj *et al.*, 2008).

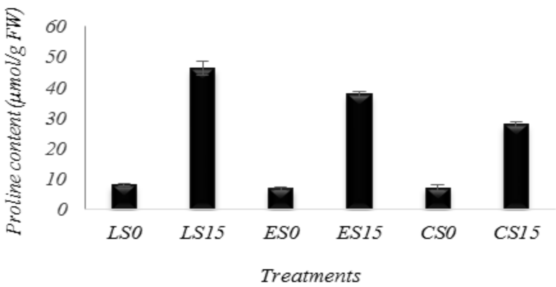


شکل ۱- تاثیر لوتئولین در غلظت‌های مختلف بر بیان ژن گره‌زایی *R. meliloti* در یونجه

Figure 1- Effect of Luteolin at different concentrations on the induction activity of nod genes in *R. meliloti* in alfalfa. The extended bars represent ±standard error.

محتوای پرولین

افزایش پرولین تحت تاثیر تنش‌ها یک واکنش معمول توسط گیاهان است. در این آزمایش نیز، تحت تاثیر شوری میزان پرولین یونجه تقریباً ۴ برابر افزایش یافت. در شرایط غیرشور کاربرد القاکننده‌ها بر محتوای پرولین معنی‌دار نبود، ولی در شرایط شور لوتئولین و ترشحات بذر به‌ترتیب ۱/۶۶ و ۱/۳۵ برابر محتوای پرولین را افزایش دادند (شکل ۲). پرولین یکی از اسمولیت‌های مهم است که گیاهان و میکروارگانیسم‌ها در مواجهه با شوری و تنش آبی تولید می‌کنند. افزایش مقدار پرولین تحمل به شوری را بهبود می‌بخشد (Campanelli *et al.*, 2013). تجمع پرولین در شرایط شوری منجر به کاهش گلوتامات در بیوسنتز کلروفیل می‌شود (Valia *et al.*, 1993).



شکل ۲- تاثیر القاکننده‌های خارجی و شوری بر محتوای پرولین یونجه

Figure 2- The effect of inducers and salinity on proline content of alfalfa

S_0: سطح شوری شاهد، L: کاربرد مستقیم لوتئولین روی سطح بذر، S_{15}: شوری ۱۵ دسی‌زیمنس بر متر، E: کاربرد مستقیم ترشحات بذر روی سطح بذر، C: شاهد (بدون استفاده از القاکننده خارجی)

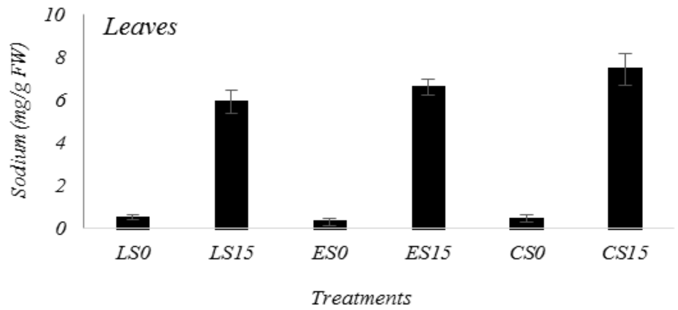
محتوای سدیم و پتاسیم

با توجه به شکل‌های ۳ و ۴ شوری منجر به افزایش ۷ و ۸/۵ برابری تجمع سدیم به‌ترتیب در برگ و ریشه یونجه شد که مطابق با نتایج Zeng *et al.* (2015); Farissi *et al.* (2014); Wang *et al.* (2012); Ghoulam *et al.* (2002) بود. تجمع شوری در اندام ریشه بیشتر از برگ بود، ریشه اولین اندامی است که تنش شوری را درک و پاسخ می‌دهد (Wang *et al.*, 2012). در آزمایشی هم که توسط Zeng *et al.* (2015) انجام شد تجمع سدیم در ریشه بیشتر از اندام هوایی بود. در شرایط شوری لوتئولین و ترشحات بذر تجمع سدیم را در ریشه و برگ کاهش دادند که این کاهش در برگ معنی‌دار نبود ولی در ریشه معنی‌دار بود. در شرایط شوری افزایش یون‌های معدنی نقش مهمی را در تنظیم اسمزی بازی می‌کند (Farissi *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2015). نقش یون‌های معدنی در تنظیم اسمزی بین ۵۹ تا ۹۰٪ است در حالی‌که سولوت‌های آلی ۱۰ تا ۳۷٪ نقش دارند که نشان‌دهنده نقش مهم یون‌های معدنی در تنظیم اسمزی است (Zeng *et al.*, 2015). بیشتر بودن مشارکت یون‌های

معدنی در تنظیم اسمزی توسط Wang *et al.*, (2012) نیز گزارش شده است. تجمع یون‌های معدنی از لحاظ متابولیکی مفیدتر هستند زیرا انرژی که برای جذب آن‌ها مصرف می‌شود بسیار کمتر از انرژی است که برای سنتز اسمولیت‌های آلی نیاز است (Zeng *et al.*, 2015). یون‌های معدنی اسمولیت‌های غیرآلی هستند که در شرایط شوری در واکوئل تجمع می‌یابند (Zeng *et al.*, 2015).

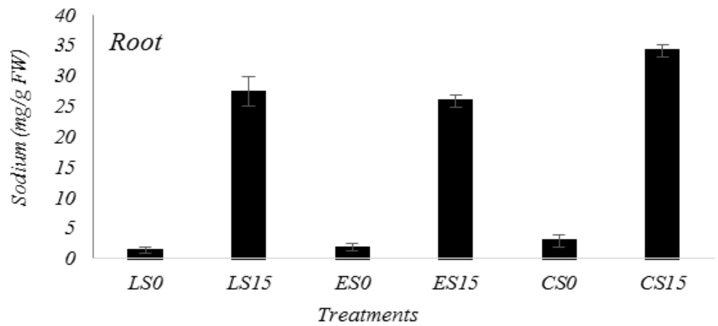
در شرایط شوری مقدار پتاسیم در ریشه و برگ کاهش یافت (شکل‌های ۵ و ۶). این کاهش در ریشه و برگ به‌ترتیب ۲۴٪ و ۲۹٪ بود. کاربرد لوتئولین و ترشحات بذر تا حدی این کاهش را جبران کردند و در شرایط شور منجر به افزایش محتوای پتاسیم در برگ و ریشه گیاه شدند که این افزایش معنی‌دار بود (شکل‌های ۵ و ۶).

کاهش معنی‌دار k^+ در بافت‌های گیاهی با افزایش شوری را می‌توان با تاثیر آنتاگونیستی Na^+ بر جذب پتاسیم توضیح داد (Farissi *et al.*, 2014; Dadkhah, 2011). نتایج مشابه برای گیاهان *Beta vulgaris* L. (Ghoulam *et al.*, 2002), *Lycopersicon esculentum* Mill. (Juan *et al.*, 2005) و *Schinopsis quebracho* (Meloni *et al.*, 2008) نیز گزارش شده است. همچنین، سدیم می‌تواند با پتاسیم در سایت‌های پیوندی مشابه رقابت کند (Lokhande *et al.*, 2011). نقش پتاسیم در تنظیم اسمزی ۸٪ است که البته با افزایش شوری این نقش کمتر می‌شود (Zeng *et al.*, 2015).



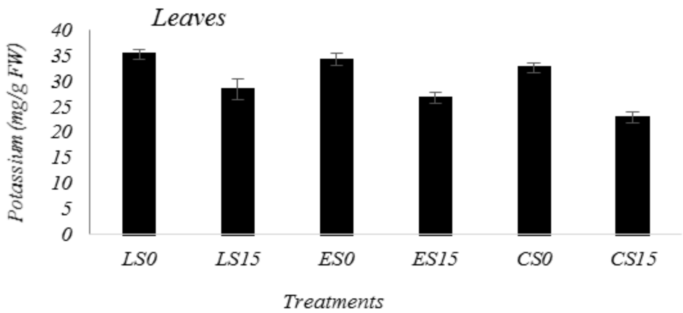
شکل ۳- تاثیر القاکننده‌های خارجی و شوری بر محتوای سدیم برگ یونجه

Figure 3- The effect of inducers and salinity on sodium content of alfalfa leaves



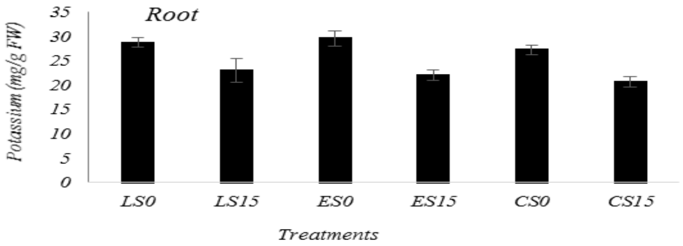
شکل ٤- تاثیر القاکننده‌های خارجی و شوری بر محتوای سدیم ریشه یونجه

Figure 4- The effect of inducers and salinity on sodium content of alfalfa root



شکل ۵- تاثیر القاکننده‌های خارجی و شوری بر محتوای پتاسیم برگ یونجه

Figure 5- The effect of inducers and salinity on potassium content of alfalfa leaves



شکل ٦- تاثیر القاکننده‌های خارجی و شوری بر محتوای پتاسیم ریشه یونجه

Figure 6- The effect of inducers and salinity on potassium content of alfalfa root

S_0: سطح شوری شاهد، L: کاربرد مستقیم لوتئولین روی سطح بذر، S_{15}: شوری ۱۵ دسی‌زیمنس بر متر، E: کاربرد مستقیم ترشحات بذر روی سطح بذر، C: شاهد (بدون استفاده از القاکننده خارجی)

غلظت کلروفیل a و b

با توجه به نتایج تجزیه واریانس تیمار شوری در سطح ۱٪ تاثیر معنی‌دار بر غلظت کلروفیل a و b داشت. تاثیر القاکننده‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۱). شوری غلظت کلروفیل a و b را تقریباً ۵۰٪ کاهش داد (جدول ۲). به نظر می‌رسد افزایش غلظت یون‌های سمی از جمله یون سدیم در بافت برگ، در اثر شوری موجب تخریب کلروفیل می‌شود (Asch and All, 2000). در آزمایشی هم که توسط Farhangian (2009) انجام شد غلظت کلروفیل در اثر شوری کاهش یافت.

تعداد گره

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که تیمارهای شوری، القاکننده‌های خارجی و اثر متقابل آن‌ها تاثیر معنی‌دار در سطح ۱٪ بر این صفت داشت. مقایسه میانگین تیمارها (جدول ۲) نشان داد که شوری تقریباً ۶۰٪ این صفت را کاهش داد و تیمار بذر با القاکننده‌ها تقریباً ۴۷٪ تعداد گره را افزایش داد که اختلاف معنی‌داری بین دو القاکننده وجود نداشت. همچنین اختلاف معنی‌داری بین شاهد و پیش‌تیمار باکتری‌ها با لوتئولین وجود نداشت. بیشترین تعداد گره در شرایط شور و غیرشور به‌ترتیب به تعداد ۱۸/۳۳ و ۴۶ عدد در تیمار بذر با لوتئولین و ترشحات بذر بود.

ارتفاع گیاه

با توجه به جدول ۱ تیمارهای شوری و کاربرد القاکننده‌های خارجی و اثر متقابل آن‌ها در سطح ۱٪ تاثیر معنی‌داری بر این صفت داشت و تاثیر سویه باکتری بر این صفت در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. با توجه به نتایج مقایسه میانگین (جدول ۲) شوری ارتفاع بوته‌ها را تقریباً ۷۰٪ کاهش داد. تیمار بذرها با القاکننده‌های خارجی ارتفاع بوته‌ها را نزدیک به ۳۰٪ افزایش داد البته اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار لوتئولین و ترشحات بذر وجود نداشت (جدول ۲). در این آزمایش اختلاف معنی‌داری بین شاهد و پیش‌تیمار باکتری با لوتئولین مشاهده نشد. همچنین استفاده از باکتری مقاوم به شوری منجر به افزایش ۶ درصدی ارتفاع بوته‌ها شد. با توجه به مقایسه میانگین‌ها بیشترین ارتفاع بوته در شرایط شور و غیر شور با طول ۱۲و ۳۶/۳۳ سانتی‌متر به‌ترتیب مربوط به تیمار بذرها با ترشحات بذر و لوتئولین بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر شوری و القاکننده‌های خارجی بر صفات مورد بررسی

Table 1- Analysis of variance for the effects of salinity and inducers on some traits of alfalfa

S.O.V	d.f	Shoot dry weight	Root dry weight	Height	The number of nodule	Chlorophyll a	Chlorophyll b
Rep	2	0.049^{*}	0.088^{*}	76.53^{**}	15.38^{*}	46.54^{*}	390.12^{*}
Salinity (S)	1	1.97^{**}	5.23^{**}	8738.26^{**}	10479.26^{**}	3529.53^{**}	2189.19^{**}
Inducers (T)	3	0.22^{**}	0.39**	181.52^{**}	4775.03^{**}	11.13^{ns}	134.24^{ns}
Alfalfa cultivars (V)	1	0.007^{ns}	0.022^{ns}	6.20^{ns}	10.01^{ns}	29.34^{ns}	99.87^{ns}
Strain of Bacteria (R)	1	0.023^{ns}	0.067^{ns}	46.62^{*}	10.01^{ns}	24.76^{ns}	101.98^{ns}
S×T	3	0.074^{**}	0.16^{**}	78.94^{**}	253.87^{**}	19.04^{ns}	139.64^{ns}
S×V	1	0.002^{ns}	0.015^{ns}	11.76^{ns}	2.34^{ns}	14.17^{ns}	87.65^{ns}
S×R	1	0.006^{ns}	0.057^{ns}	102.30^{**}	2.34^{ns}	17.56^{ns}	127.85^{ns}
T×V	3	0.035^{*}	0.094^{*}	10.58^{ns}	3.95^{ns}	23.24^{ns}	132.76^{ns}
T×R	3	0.007^{ns}	0.009^{ns}	3.40^{ns}	3.01^{ns}	18.45^{ns}	87.53^{ns}
V×R	1	0.007^{ns}	0.005^{ns}	17.001^{ns}	3.76^{ns}	10.81^{ns}	90.73^{ns}
S×T×V	3	0.021^{ns}	0.05^{ns}	15.96^{ns}	2.01^{ns}	34.45^{ns}	152.63^{ns}
S×V×R	1	0.021^{ns}	0.002^{ns}	12.9^{ns}	0.01^{ns}	21.65^{ns}	138.98^{ns}
S×T×R	3	0.001^{ns}	0.009^{ns}	88.26^{ns}	0.39^{ns}	15.17^{ns}	78.54^{ns}
T×V×R	3	0.010^{ns}	0.017^{ns}	22.18^{ns}	0.59^{ns}	29.54^{ns}	134.74^{ns}
S×T×V×R	3	0.010^{ns}	0.045^{ns}	1.43^{ns}	2.12^{ns}	30.18^{ns}	149.23^{ns}
Error	62	0.012	0.029	10.39	3.28	44.17	99.01

**، * و ^{ns} به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار

*, ** and ^{ns}: significant at 1% and 5% levels of probability, and non- significant, respectively

وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه

تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر تیمارهای شوری، القاکننده‌ها و اثر متقابل آن‌ها بر وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد ولی اثر نوع رقم، باکتری و اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود. شوری تقریباً ۸۰٪ وزن خشک شاخسار و ریشه را کاهش داد (جدول ۲). همچنین تیمار بذرهای یونجه با لوتئولین و ترشحات بذر این صفات را به‌طور متوسط ۳۰٪ افزایش داد که البته بیشترین تاثیر مربوط به تیمار بذرها با ترشحات بذر بود ولی با این وجود اختلاف معنی‌داری بین این دو القاکننده مشاهده نشد (جدول ۲). در این آزمایش اختلاف معنی‌داری بین شاهد و پیش‌تیمار باکتری‌ها با لوتئولین وجود نداشت. وزن خشک اندام هوایی و ریشه در باکتری مقاوم به شوری افزایش جزئی نشان داد ولی این افزایش معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین وزن خشک ریشه در شرایط شور و غیر شور به‌ترتیب با وزن ۰/۲۱ و ۱/۰۷ گرم در هر بوته مربوط به تیمار بذرهای یونجه با ترشحات بذر و وزن خشک شاخسار به‌ترتیب با وزن ۰/۱۵ و ۰/۷۱ گرم در هر بوته به‌ترتیب مربوط به تیمارهای لوتئولین و ترشحات بذر بود.

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی یونجه تحت شوری و القاکننده‌های خارجی

Table 2- comparison of some traits of alfalfa under salinity and inducers

Treatments	Shoot dry weight ($g.plant^{-1}$)	Root dry weight ($g.plant^{-1}$)	Height (cm)	The number of nodule	Chlorophyll a content ($mg.g\ FW^{-1}$)	Chlorophyll b content ($mg.g\ FW^{-1}$)
$S_0E_lV_1R_h$	0.15 hijk	0.26 ghijk	22.33 de	23.66 c	0.57a	0.48ab
$S_0E_lV_1R_m$	0.17 ghijk	0.30 fghijk	23.66 cd	24.33 c	0.59a	0.47ab
$S_0E_lV_2R_h$	0.22 fghij	0.32 efghij	23.00 cd	23.66 c	0.60a	0.50a
$S_0E_lV_2R_m$	0.22 fghij	0.31 fghij	25.33 cd	24.33 c	0.59a	0.51a
$S_0P_lV_1R_h$	0.44 bcde	0.65 cd	27.66 bc	42.00 b	0.58a	0.49ab
$S_0P_lV_1R_m$	0.71 a	0.96 ab	36.33 a	43.66 ab	0.60a	0.52a
$S_0P_lV_2R_h$	0.42 bcde	0.63 cd	28.00 bc	42.00 b	0.59a	0.52a
$S_0P_lV_2R_m$	0.38 cdef	0.55 cdef	32.66 ab	44.33 ab	0.58a	0.45ab
$S_0P_tV_1R_h$	0.44 bcde	0.67 cd	25.33 cd	43.00 b	0.59a	0.52a
$S_0P_tV_1R_m$	0.51 bcd	0.68 cd	30.66 b	42.66 b	0.62a	0.50a
$S_0P_tV_2R_h$	0.56 abc	0.75 bc	27.66 bc	44.00 ab	0.61a	0.53a
$S_0P_tV_2R_m$	0.58 ab	1.07 a	30.66 b	46 a	0.60a	0.55a
$S_0shaV_1R_h$	0.29 efghi	0.42 defghi	17.66 e	22.66 c	0.56a	0.48ab
$S_0shaV_1R_m$	0.30 efgh	0.49 cdefgh	22.00 de	23.00 c	0.58a	0.53a
$S_0shaV_2R_h$	0.34 defg	0.52 cdefg	25.00 cd	24.00 c	0.60a	0.52a
$S_0shaV_2R_m$	0.36 cdef	0.59 cdef	23.00 cd	24.33 c	0.63a	0.55a
$S_{15}E_lV_1R_h$	0.07 jk	0.08 jk	6.53 gh	10.00 e	0.30b	0.26c
$S_{15}E_lV_1R_m$	0.03 k	0.04 jk	4.25 gh	8.00 e	0.32b	0.29c
$S_{15}E_lV_2R_h$	0.02 k	0.02 k	4.50 gh	8.33 e	0.32b	0.31bc
$S_{15}E_lV_2R_m$	0.05 jk	0.04 jk	5.00 gh	9.00 e	0.33b	0.30bc
$S_{15}P_lV_1R_h$	0.08 jk	0.15 ijk	7.66 fgh	17.33 d	0.32b	0.32bc
$S_{15}P_lV_1R_m$	0.12 ijk	0.13 jk	5.50 gh	17.33 d	0.33b	0.34bc
$S_{15}P_lV_2R_h$	0.08 jk	0.10 Jk	9.33 fg	15.66 d	0.34b	0.32bc
$S_{15}P_lV_2R_m$	0.13 hijk	0.12 jk	7.16 fgh	d18.33 d	0.34b	0.30bc
$S_{15}P_tV_1R_h$	0.10 jk	0.11 jk	12 f	16.00 d	0.32b	0.33bc
$S_{15}P_tV_1R_m$	0.12 ijk	0.17 ijk	9.33 fg	16.00 d	0.34b	0.35bc
$S_{15}P_tV_2R_h$	0.15 hijk	0.21 hijk	8.66 fgh	18.00 d	0.32b	0.34bc
$S_{15}P_tV_2R_m$	0.23 fghij	0.15 ijk	7.75 fgh	17.00 d	0.31b	0.37bc
$S_{15}shaV_1R_h$	0.07 jk	0.07 jk	4.00 h	9.33 e	0.30b	0.28c
$S_{15}shaV_1R_m$	0.06 jk	0.09 Jk	9.33 fg	8.66 e	0.30b	0.30bc
$S_{15}shaV_2R_h$	0.08 jk	0.10 jk	7.83 fgh	8.00 e	0.32b	0.26c
$S_{15}shaV_2R_m$	0.08 jk	0.12 jk	6.83 fgh	8.66 e	0.33b	0.22c

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using LSD test.

S_0: سطح شوری شاهد، E_l: پیش تیمار سویه‌های ریزوبیوم با لوتئولین، S_1: شوری ۱۵ دسی‌زیمنس بر متر، P_l: کاربرد مستقیم لوتئولین روی سطح بذر، V_1 و V_2 دو رقم یونجه، P_t: کاربرد مستقیم ترشحات بذر روی سطح بذر، R_m و R_h سویه ریزوبیوم مقاوم و حساس به شوری، sha: شاهد (بدون استفاده از القاکننده خارجی)

لوتئولین یکی از مهم‌ترین فلاونوئیدهای یونجه در بیان ژن nod می‌باشد که از بذرهای در حال جوانه‌زنی ترشح می‌شود و در ترشحات ریشه یونجه وجود ندارد. در طول ۴ ساعت اول آبنوشی، فعالیت کل بیان ژن توسط بذرها ۱۰۰ برابر بیشتر از بیان ژن توسط ریشه‌ها از گیاهچه‌های ۷۲ ساعته بود (Hartwig *et al.*, 1990). Kapulnik *et al.* (1987) وقتی لوتئولین به ریزوسفر اضافه کردند، افزایش معنی‌داری را در گره‌زایی، تثبیت نیتروژن و رشد گیاهچه یونجه مشاهده کردند. در آزمایشی نسبت شاخساره/ریشه برای صفر و

μM۱۰ لوتئولین به‌ترتیب ۲/۴۱ و ۲/۴۵ بود (Kapulnik *et al.*, 1987). در آزمایشی هم که توسط Begum *et al.* (2001) اجرا شد عملکرد نخود در تیمار آغشته کردن بذر با القاکننده‌های نارینجنین و هسپرتین نسبت به پیش‌تیمار باکتری‌ها با این القاکننده‌ها بیشتر بود که مطابق با نتایج این آزمایش بود.

Novak *et al.* (2002) با توجه به آزمایشی که انجام داد بیان کرد که به نظر نمی‌رسد، فلاونوئیدهایی که به‌طور طبیعی از ریشه نخود آزاد می‌شوند برای القا کامل ژن‌های nod در محلول غذایی کافی باشد. در این آزمایش که به‌صورت هیدروپونیک انجام شد، مشاهده شد که وقتی گیاهچه‌های تلقیح نشده یک هفته‌ای نخود، با باکتری تلقیح شدند محلول غذایی حاوی ترشحات یک روزه ریشه، قادر بود فقط ۳٪ از حداکثر فعالیت ژن nod را القا کند. در آزمایشی هم ۱۰۰٪ فعالیت القایی ۴ روز پس از تلقیح در محلول غذایی مشاهده شد (Zaat *et al.*, 1988). به نظر می‌رسد به همین دلیل اضافه کردن فلاونوئیدها به محیط رشد گیاه، منجر به افزایش گره-زایی می‌شود (Novak *et al.*, 2002).

در این آزمایش همچنین از ترشحات بذر خود گیاه یونجه به‌عنوان القاکننده استفاده شد. که با توجه به نتایج آزمایش، تاثیر این ترکیب بر صفات مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری با لوتئولین نداشت. استفاده از ترشحات بذر و گیاه به‌عنوان فعال‌کننده ژن گره‌زایی ریزوبیوم‌ها اقتصادی‌تر می‌باشد حتی اگر آن‌ها مخلوطی از القاکننده‌ها و بازدارنده‌ها باشند. در آزمایشی ترشحات بذر نسبت به فلاونوئید سنتتیک، بیان ژن گره‌زایی ریزوبیوم‌ها را ۵۰ برابر بیشتر افزایش داد. در این آزمایش پیش‌تیمار باکتری‌ها با ترشحات بذر شبدر منجر به افزایش معنی‌دار وزن تر ریشه و شاخساره و تعداد گره‌های شبدر شد (Maj *et al.*, 2010) که با نتایج این آزمایش مطابقت داشت.

برخلاف نتایج آزمایش‌های دیگر (Begum *et al.*, 2001; Zhang and Smith, 1996; Hungria and Phillips, 1993; Maj *et al.*, 2010; Mabood and Smith, 2005) در این آزمایش پیش‌تیمار ریزوبیوم با القاکننده خارجی در صفات مورد بررسی در یونجه با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت که احتمال دارد مربوط به مرگ و میر ریزوبیوم‌ها روی بذر باشد (Deaker *et al.*, 2004) به نظر می‌رسد برای استفاده از این تکنیک نیاز به روش جدیدی است که هم مقرون به‌صرفه باشد و هم قابل تولید توسط تولیدکنندگان باشد (Deaker *et al.*, 2004).

نتیجه‌گیری

لوتئولین یکی از مهم‌ترین فلاونوئیدهای یونجه در بیان ژن گره‌زایی می‌باشد در این آزمایش نیز لوتئولین بیان ژن *nodA* را افزایش داد. با وجود این‌که پیش‌تیمار ریزوبیوم با لوتئولین تاثیر معنی‌داری بر صفات مورد بررسی نداشت. ولی آغشته کردن بذور یونجه با لوتئولین و ترشحات بذر منجر به افزایش گره‌زایی و رشد در شرایط عادی و شور شد. بنابراین این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان القاکننده‌های خارجی در بهبود رشد و گره‌زایی یونجه در شرایط شور و عادی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، در این آزمایش تاثیر ترشحات بذر بر صفات مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری با لوتئولین نداشت. استفاده از ترشحات بذر و گیاه به‌عنوان القاکننده اقتصادی‌تر می‌باشد. با این حال، استفاده از القاکننده‌ها برای افزایش گره‌زایی و عملکرد زمانی مفید است که القاکننده‌ها توسط عوامل زراعی و وضعیت ژنتیکی خود گیاه محدود شده باشند. لذا، بهتر است، ابتدا کاربرد آن در مزارع و گیاهان مورد کاشت مطالعه و سپس مورد استفاده قرار گیرد. چون با توجه به نتایج این آزمایش به نظر می‌رسد استفاده از فلانوئیدها یک روش مناسب برای بهبود گره‌زایی می‌باشد. در این آزمایش با توجه به آستانه تحمل یونجه شوری ۱۵ دسی‌زیمنس بر متر که در آن ۷۵ درصد عملکرد کاهش می‌یابد انتخاب شد که در این شوری القاکننده‌های خارجی تاثیر مناسبی بر افزایش عملکرد و گره‌زایی یونجه داشت، بنابراین کاربرد القاکننده‌های خارجی در سطوح شوری پایین‌تر و در شرایط مزرعه به شرط بررسی اولیه توصیه می‌گردد.

References

1. Abd Alla, M. H., Bagy, M. K., El-enany, A. S., and Bashandy, S. R. 2014. Activation of Rhizobium tibeticum With Flavonoids Enhances Nodulation, Nitrogen Fixation, and Growth of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) Grown in Cobalt-Polluted Soil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 66: 303-315.
2. Arnon, D. I. 1967. Copper anzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. Pant Physiology 24: 1-10.
3. Asch, F., Dingkuhn, M., and Droffling, K. 2000. Salinity increases CO_2 assimilation but reduces growth in field growth irrigated rice. Plant and Soil 218: 1-10.
4. Bates, L. S., Waldren, R. P., and Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
5. Begum, A. A., Leibovitch, S., Migner, P., and Zhang, F. 2001a. Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of Rhizobium leguminosarum increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. Journal of Experimental Botany 52: 1537-1543.

6. Begum, A. A., Leibovitch, S., Migner, P., and Zhang, F. 2001b. Inoculation of pea (*Pisum sativum* L.) by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* preincubated with naringenin and hesperetin or application of naringenin and hesperetin directly into soil increased pea nodulation under short season conditions. Plant and Soil 237: 71-80.
7. Bouhmouch, I., Souad-Mouhsine, B., Brhada, F., and Aurag, J. 2005. Influence of host cultivars and rhizobium species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. Journal of Plant Physiology 162: 1103-1113.
8. Bruning, B., and Rozema, J. 2012. Symbiotic nitrogen fixation in legumes: Perspectives for saline agriculture. Environmental and Experimental Botany 92: 134-143.
9. Campanelli, A., Ruta, C., Morone-Fortunato, I. and Mastro, G. D. 2013. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) clones tolerant to salt stress: in vitro selection. Central European Journal of Biology 8 (8): 765-776.
10. Cooper, J. E. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. Journal of Applied Microbiology 103: 1355-1365.
11. Dadkhah, A. 2011. Effect of Salinity on Growth and Leaf Photosynthesis of Two Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Cultivars. Journal of Agricultural Science and Technology 13: 1001-1012.
12. Deaker, R., Roughley, R. J., and Kennedy, I. R. 2004. Legume seed inoculation technology. Soil Biology and Biochemistry 36: 1275-1288.
13. Farhangian, S. 2009. The effect of salinity on chlorophyll content of *Onobrychis sativa* and *Medicago sativa.* Plant and Ecosystem 18: 77- 89.
14. Farissi, M., Faghire, M., Bargaz, A., Bouizgaren, A., Makoudi, B., Sentenac, H., and Ghoulam, C. 2014. Growth, nutrients concentrations, and enzymes involved in plants nutrition of alfalfa populations under saline conditions. Journal of Agricultural Science and Technology 16: 301-314.
15. Garg, B., Dogra, R. C., and Shama, P. K. 1999. High-efficiency transformation of Rhizobium leguminosarum by electroporation. Applied and Environmental Microbiology 65: 2802-4.
16. Ghasem, F., Poustini, K., Besharati, H., Mohammadi, V. A., Abooei Mehrizi, F., and Goettfert, M. 2012. Pre-incubation of *Sinorhizobium meliloti* with Luteolin, Methyl jasmonate and Genistein Affecting Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Growth, Nodulation and Nitrogen Fixation under Salt Stress Conditions. Journal of Agricultural Science and Technology 14: 1255-1264.
17. Ghoulam, C., Foursy, A., and Fares, K. 2002. Effects of Salt Stress on Growth, Inorganic Ions and Proline Accumulation in Relation to Osmotic Adjustment in Five Sugar Beet Cultivars. Environmental and Experimental Botany 47: 39-50.
18. Hartwig, U. A., Maxwell, C. A., Joseph, C. M., and Phillips, D. A. 1990. Chrysoeriol and Luteolin Released from Alfalfa Seeds Induce nod Gene *sin Rhizobium meliloti*. Plant Physiology 92: 116-122.
19. Hirsch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. New Phytologist 122: 211-237.
20. Hungria, M., and Phillips, D. A. 1993. Effects of a seed color mutation on rhizobial nod- gene- inducing flavonoids and nodulation in common bean. Molecular Plant-Microbe Interactions 6: 418-22.
21. Juan, M., Rivero, R. M., Romero, L., and Ruiz, J. M. 2005. Evaluation of Some Nutritional and Biochemical Indicators in Selected Salt Resistance Tomato Cultivars. Environmental and Experimental Botany 54: 193-201.
22. Kapulnik, Y., Joseph, C. M., and Phillips, D. A. 1987. Flavone limitations to root nodulation and *symbiotic nitrogen fixation in alfalfa.* Plant Physiology 84: 1193-1196.
23. Lokhande, V. H., Nikam, T. D., Patade, V. Y., Ahire, M. L., and Suprasanna, P. 2011. Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on antioxidative defence, osmolytes and in vitro growth responses in *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell, Tissue Organ Culture 104: 41-49.
24. Mabood, F., and Smith, D. L. 2005. Pre-incubation of *Bradyrhizobium japonicum* with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures. Physiologia Plantarum 125: 311-323.
25. Maj, D., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., and Skorupska A. 2010. Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. Microbiological Research 165: 50-60.
26. Meloni D. A., Gulotta, M. R., and Martinez, C. A. 2008. Salinity Tolerance in *Schinopsis quebracho* Colorado: Seed Germination, Growth, Ion Relations and Metabolic Responses. Journal of Arid Environments 72: 1785-1792.
27. Miller, J. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
28. Miransari, M., and Smith, D. L. 2009. Alleviating salt stress on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Bradyrhizobium japonicum symbiosis, using signal molecule genistein. European Journal of Soil Biology 45: 146-152.
29. Mulligan, J. T., and Long, S. R. 1989. A family of activator genes regulates expression of Rhizobium meliloti nodulation genes. Genetics 122: 7-18.
30. Novak, K., Chovance, P., Skrdleta, V., Kropacova, M., Lisa, L., and Nemcova, M. 2002. Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). Journal of Experimental Botany 53 (375): 1735-1745.
31. Oldroyd, G. E. D., and Downie, J. A. 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5: 566-576.

32. Pérez-Montaño, F., Guasch-Vidal, B., González-Barroso, S., López-Baena, F. J., and Cubo, T. 2011. Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of *N*-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. Research in Microbiology 162: 715-723.
33. Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W. J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 180-201.
34. Soussi, M., Lluch, C., and Ocana, A. 1999. Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. Journal of Experimental Botany 50: 1701-1708.
35. Tambalo, D. D., Vanderlinde, E. M., Robinson, S., Halmillawewa, A., Hynes, M. F., and Yost, C. K. 2013. Legume seed exudates and *Physcomitrella patens* extracts influences warming behavior in *Rhizobium leguminosarum.* Canandian Journal of Microbiology 60: 15-24.
36. Tu, J. C. 1981. Effect of salinity on rhizobium-root-hair interaction nodulation and growth of soybean. Canadian Journal of Plant Science 61: 231-239.
37. Valia, R. Z., Patel, V. K. and Kaadia, P. K. 1993. Physiological response of drumstick (*Moringoolifera* Lamk) to varying Levels of ESP. Indian Journal of Plant Physiology 36 (4): 261-262.
38. Wang, X., Chen, W., Zhou, Y., Han, J., Zhao, J., Decheng Shi, D., and Yang, C. 2012. Comparison of adaptive strategies of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to salt and alkali stresses. Australian Journal of Crop Science 6 (2): 39-315.
39. Zaat, S. A., Wijffelman, C. A., Mulders, I. H. M., van Brussel, A. A. N., and Lugtenberg, B. J. J. 1988. Root exudates of various host plants of Rhizobium leguminosarum contain different sets of inducers of Rhizobium nodulation genes. Plant Physiology 86: 1298-303.
40. Zahran, H. H., and Sprent, J. I. 1986.Effects of sodium-chloride and polyethyleneglycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. Planta 167: 303-309.
41. Zeng, Y., Li, L., Yang, R., Yi, X., and Zhang, B. 2015. Contribution and distribution of inorganic ions and organic compounds to the osmotic adjustment in *Halostachys caspica* response to salt stress. Scientific Reports 1-11.
42. Zhang, F., and Smith, D. L. 1996. Inoculation of soybean [*Glycine max (L) Merrill*] with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. Plant and Soil 179: 33-241.

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 18, No. 1, Spring. 2020, p. 49-59

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹، ص. ۵۹-۴۹

The Effect of Nodulation Inducers on Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Yield and Nodulation under Optimal and Salinity Conditions

R. Mardani[1*], K. Poustini[2], A. R. Abbasi[3], A. A. Pourbabaei[4]

Received: 05-04-2018
Accepted: 24-02-2019

Introduction

Luteolin is one of the most important flavonoids, which release from seeds during the first four hours of imbibition. On the other hand, at present, salinity is one of the most important factors in reducing crop production. The results of some studies show that the use of external flavonoids increases expression of nod genes, yield and nodulation in some legumes species under stress conditions. Therefore, this experiment was conducted with the aim of investigating the effect of luteolin and alfalfa seed exudates external inducers on the expression of *Rhizobium* nod gene and the yield and nodulation of alfalfa in normal and salinity condition.

Materials and Methods

We studied the effect of luteolin on the induction of nod genes in *R. Meliloti* carrying a plasmid with a translational fusion between *R. Meliloti* nodA and lacZ of *Escherichia* coli, and the expression activity was measured by β-galactosidase activity. Luteolin strongly induced the expression of nod genes inhibitory effects. We further studied the effect of luteolin and Seed exudate on alfalfa (*Medicago sativa* L.) yield and nodulation under optimal and salinity condition. One greenhouse was conducted to determine whether the pre-incubation of *Rhizobium meliloti* with luteolin and application of luteolin and seed exudate directly on to the seed surface can increase alfalfa nodulation and yield. The factorial experiment was arranged based on randomized complete block design, with three replications. Treatments were two cultivars, two bacterial strains (Sensitive and resistant strains), two levels of salt (0 and 15 $dS.m^{-1}$ of NaCl) and two levels of application of inducers along with control.

Results and Discussion

The results from this experiment clearly indicated that inoculation of alfalfa seeds with luteolin and seed exudate increase alfalfa nodulation (47%) and yield (30%) significantly under salinity condition that these treats affect on traits more under normal condition. But significant effect was not observed on chlorophyll content. In this experiment a significant difference was not observed between the control and pre-incubation of *R. meliloti*. Also, salinity increased proline four times compared to normal condition. Luteolin and seed exudates increased proline 1.66 and 1.35 times respectively in salinity condition, but under normal condition they did not have significant effect. Salinity increased the content of sodium in the leaves (7 times) and roots (8.5 times) and decreased the content of potassium 29% and 24% in these organs of the plant, respectively, that, luteolin and seed exudate partially moderated these changes.

Conclusions

The results of this experiment indicated that luteolin and seed exudate can be used as exogenous inducers to improve the growth and nodulation of alfalfa under salinity and normal condition. Flavonoid inducers act in low concentration, and their negative effects relate to reduced germination and growth. In general, it seems that the application of flavonoid inducers is more suitable to improve nodulation, but the direct application of them in agriculture should be used only in specified cases and when flavonoids are as a limiting factor.

Keywords: Inducers, LacZ gene, Luteolin, Seed exudate

1, 2 and 3- PhD student, Professor and Associate Professor, respectively, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran
4- Associate Professor, Department of Soil Science, University of Tehran
(*- Corresponding Author Email: rm.mardani@ut.ac.ir)